

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-136505

(43) 公開日 平成7年(1995)5月30日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
B 0 1 J 20/26		G 7202-4G		
A 6 1 M 1/36	5 4 5	9052-4C		
B 0 1 D 15/00		Z		
G 0 1 N 30/48		R 8310-2 J		
// A 6 1 K 35/12		7431-4C		

審査請求 未請求 請求項の数1 OL (全4頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-288544

(22) 出願日 平成5年(1993)11月17日

(71) 出願人 000109543

テルモ株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号

(72) 発明者 大西 誠人

神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地

テルモ株式会社内

(54) 【発明の名称】 アフィニティー分離材料

(57) 【要約】

【目的】 標的物質に対する高い特異性を有し標的物質を簡便に回収できる分離材料及び分離システムを提供する。

【構成】 標的物質に対して特異的親和性を有する物質Aを、物質Bと物質Cの結合体を介して、刺激応答性高分子とともに表面に担持させたことを特徴とするアフィニティー分離材料。並びに、該分離材料を用いて標的細胞を吸着した後、刺激応答性高分子の高次構造を変化させることにより物質Bと物質Cとの結合を解離させ、標的物質を該分離材料より脱離する分離方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 標的物質に対して特異的親和性を有する物質を、互いに結合能のある少なくとも2種の化合物の結合体からなるスペーサーを介して、刺激応答性高分子とともに表面に担持させたことを特徴とするアフィニティ分離材料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、標的物質に対して特異的親和性を有する物質と刺激応答性高分子を利用した新

【0002】

【従来の技術】 近年、細胞工学や遺伝子工学等の発展に伴い、細胞や遺伝子を利用した細胞治療や遺伝子治療の研究が盛んとなっており、それらの生体物質を損傷させることなく分離精製する技術が望まれている。また、バイオテクノロジーの発展により、生物工学的手法によるペプチド、蛋白質、糖蛋白質類といった生理活性分子の生産が行われるようになってきており、細胞やバイオプロダクツの簡便で損傷の少ない分離精製技術が望まれている。

【0003】 従来より化学工業分野で使用されている分離・精製の単位操作として、吸着・分配・蒸留・析出が知られているが、これらの方法は、熱や有機溶媒の添加などにより、被精製物質に対して、大幅な環境変化を強いるプロセスである。従って、前述の細胞やバイオプロダクツの分離には適していない。

【0004】 細胞やバイオプロダクツの分離方法として、体積（分子量）や密度による方法（沈降速度法、密度勾配遠心法、ゲル濾過法など）、電場中での移動度の差による方法（電気泳動など）、等電点による方法（焦点電気泳動など）、2液相間への分配による方法（2層分配法、分配クロマトグラフィー）、固相への吸着性の差による方法（吸着クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー）などが知られている。

【0005】 これらの分離方法の多くは、物理化学的性状が大きく異なる細胞成分の分離には適用できるものの、物理化学的性状が良く似た成分や細胞、例えばリンパ球亜集団の分離などには適用が困難であった。この中で標的物質に対する選択性の高い方法は、アフィニティークロマトグラフィーであり、近年広く利用されるようになってきている。細胞を対象とするアフィニティークロマトグラフィーとしては、標的細胞の表層に存在する膜蛋白等に対するモノクローナル抗体を結合したビーズやシャーレを用いた分離方法が報告されており、本方法による各種リンパ球の亜集団分離も報告されている（例えば、ジャーナル・オブ・イミュノロジカル・メソッド、第54号、251ページ、1983年に記載されているブラウンらの研究報告）。この抗体を用いた方法は、特異性が極めて高いことで利点であるが、欠点とし

て、吸着した細胞の脱着が困難なこと、抗体が細胞表層の抗原に結合するための時間（接触時間）を長くする必要があり、その結果、非特異的な吸着が増加することなどがあつた。

【0006】 前述の欠点を改良した方法としては、アビジン-ビオチンのような親和性の高い結合を利用して、短時間で分離材料に吸着させる方法が国際出願（WO91/16116）で提案されている。すなわち、ビオチンで標識した抗体を予め時間をかけて標的細胞に結合させた後、アビジンを結合した分離材料に吸着させることにより、短時間で効率良く標的細胞を分離できることとなる。しかしながら、この方法では、標的細胞の回収が、物理的振動によりアビジン-ビオチン結合を解離することにより行われているため、ビーズ同士の衝突による細胞の損傷や機能低下が免れない。

【0007】 細胞機能を損なわないように回収する方法としては、特開平2-211865号に記載された水に対する上限または下限臨界溶解温度が0～80℃にあるポリマーもしくはコポリマーで表面を被覆した細胞培養基材が報告されている。この方法は、温度により疎水性-親水性と相転移する温度応答性高分子を利用したものであり、温度応答性高分子が疎水性で収縮した状態の時に細胞を吸着させた後、温度を変化させ、親水性となって膨潤するときに吸着した細胞を脱着させる方法である。この方法の欠点は、細胞に対する特異性が低いため、種々の細胞が存在する液体から特定の細胞を回収することができないことである。特に、マクロファージ、白血球、リンパ球などの多くは、曲率の小さい表面に吸着することが知られており、フィルターや不織布形状に加工した分離材料を用いて、特定のリンパ球などを選択的に回収することは困難であった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 従って、本発明は、標的物質に対する高い特異性を有し標的物質を簡便に回収できる分離材料及び分離システムを提供することを目的とする。

【0009】

【問題点を解決するための手段】 上記発明の目的は以下のアフィニティ分離材料及び分離方法によって達成される。

（1） 標的物質に対して特異的親和性を有する物質Aを、互いに結合能のある少なくとも2種の化合物（物質Bと物質C）の結合体からなるスペーサーを介して、刺激応答性高分子とともに表面に担持させたことを特徴とするアフィニティ分離材料。

【0010】 （2） 標的物質に対して特異的親和性を有する物質Aを、互いに結合能のある少なくとも2種の化合物（物質Bと物質C）の結合体を介して、刺激応答性高分子とともに表面に担持させたことを特徴とするアフィニティ分離材料を用いて、標的物質を該分離材料に

結合させた後、刺激応答性高分子の高次構造を変化させて、標的物質を該分離材料より脱離させることを特徴とする分離方法。

【0011】(3)互いに結合能を有する物質Bと物質Cのいずれか一方が結合した標的物質に対して特異的親和性を有する物質Aと、互いに結合能を有する物質Bと物質Cの残った方を刺激応答性高分子とともに表面に担持させた分離材料とからなる分離システムにおいて、物質Aと標的物質を接触させると同時にしくは接触させた後に、さらに該分離材料と接触させて、該分離材料に標的物質を結合させた後、刺激応答性高分子の高次構造を変化させて、標的物質を脱離させることを特徴とする分離方法。

【0012】本発明において、標的物質は特に限定されないが、機能維持が重要であり分離が困難な細胞、例えば、上皮系細胞、肝実質細胞、脾ラ島細胞、マクロファージ、単核球、NK細胞(CD56⁺)、血液幹細胞などの未分化細胞(CD34⁺)、Bリンパ球、Tリンパ球、及びそのサブセット(CD4⁺、CD8⁺、CD19⁺、CD71⁺、IL2R⁺など)、腫瘍細胞などを好適に例示できる。標的物質に対して特異的親和性を有する物質とは、抗原-抗体、酵素-基質(阻害剤)、細胞表面のレセプターとの反応などの生体の制御機構で見られる特異的親和性を例示できる。

【0013】互いに結合能のある少なくとも2種の化合物(物質Bと物質C)の結合体とは、物質Bと物質Cとが結合能を有していればよく生体由来物質であっても合成化合物であっても、また、第3成分が結合していてもかまわないが、生理的条件下で高い親和性を有するビオチン-アビジン、ビオチン-ストレプトアビジン、リボフラビン-リボフラビン結合蛋白などの組み合わせを好適に例示できる。ビオチン-アビジンの組み合わせは、ビオチン標識抗体などが市販されており容易に入手できるため、応用性が高く好ましい。

【0014】刺激応答性高分子とは、熱、pH、電位、光などにより高次構造が変化して、水溶液中で膨潤したり収縮する高分子であればよい。例えば、水に対する上限臨界温度または下限臨界温度を有し、温度変化にตอบสนองして、膨潤-収縮する高分子を好適に例示できる。そのような高分子としては、N-イソプロピルアクリルアミドやN、N-ジエチルアクリルアミド、N-イソプロピルメタアクリルアミドなどのアクリルアミドやメタアクリルアミドの誘導体類をはじめ、ビニルメチルエーテルなどのビニルエーテル類などのポリマーやコポリマーが知られている。

【0015】光応答性の場合、例えば、アゾベンゼン基を有する吸水性高分子のように光異性化をおこす高分子、トリフェニルメタンロイコハイドロオキシドのビニル誘導体とアクリルアミド系単量体との共重合体のように光イオン解離する感応基を有する吸水性高分子、スピ

ロベンゾピランを含むN-イソプロピルアクリルアミドゲルのように疎水性相互作用が光変化する高分子などを用いることができる。

【0016】物質A、B、Cを材料表面に担持させる方法は特に限定されず、公知の方法を組み合わせることによって目的の分離材料を作製することができる。例えば、官能基を有する単量体を共重合した刺激応答性高分子を合成した後、該官能基を利用して物質Bの結合と基材表面への結合を行ったり、電子線、オゾン、 γ 線、プラズマなどを利用したグラフト法により官能基を有する単量体を共重合した刺激応答性グラフト鎖を形成させた後、物質Bを結合させたりすることができる。

【0017】一方、標的物質への特異的親和性を有する物質Aに対しては、縮合剤や架橋剤を用いて物質C結合させることができる。さらに、これらを混和することにより物質Bと物質Cとを結合させて、物質Aが、物質Bと物質Cの結合体を介して、刺激応答性高分子とともに表面に担持された分離材料を作製することができる。

【0018】分離材料の形態は、特に限定されず、プレート状、シャーレ状、繊維状、不織布状、多孔質膜、フィルター状、ビーズ状などを例示でき、それぞれの形態にあったカラムなりモジュールに収納されて使用されてもかまわない。また、その基材となる材質についても水に対して非溶解性であれば特に限定されず、ポリオレフィン、ハロゲン化ポリオレフィン、ポリウレタン、ポリアミド、ポリエステル、綿、ポリスチレン、及びそれらの変性物や共重合体など、既存の材料を例示することができる。

【0019】標的物質の分離方法は、前記の分離材料に標的物質を接触させてもかまわないし、予め物質Bと物質Cのいずれかを結合した物質Aを標的物質と接触させた後、物質Bと物質Cの残った方を結合させた分離材料と接触させることにより、分離材料に吸着する方法でもよい。

【0020】標的物質の回収は、温度等の刺激により刺激応答性高分子の高次構造を急速に変化せしめることにより、物質Bと物質Cの結合を弱めることにより行うが、回収率の向上などを目的として、必要に応じて物理的な方法や化学的な方法を併用してもかまわない。細胞やタンパク質などの非特異的吸着を抑制するため、刺激応答性高分子が緩衝液、培養液、血液、血漿などで膨潤した状態で標的物質を特異的に吸着させた後、温度等を変化させて収縮させることにより、物質Bと物質Cの結合を解離させることが好ましい。また、このとき物質Aと標的物質との特異的結合が解離することによって、標的物質が脱離してもかまわない。

【0021】本発明の分離材料は、標的物質に対する特異的親和性を有するリガンドと刺激応答性高分子とを有しているため、標的物質を選択的に吸着し、刺激応答性高分子の高次構造変化により、該標的物質を簡便に脱離

10

20

30

40

50

できる分離材料や分離システムとなる。

【0022】

【実施例】

(実施例1) 標的物質としてCD4⁺細胞を設定し、標的物質に対して特異的親和性を有する物質としてCD4に対する抗体、物質Bと物質Cの結合体としてアビジン-ビオチン結合、刺激応答性高分子としてポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を選定して、アフィニティ分離材料を作製し、CD4⁺細胞の分離を行った。

【0023】分子内に複数のパーオキサイド基を有するポリブチルメタクリレートを重ね開始剤として、N-イソプロピルアクリルアミドとメタクリル酸とを重合させ、ブチルメタクリレート疎水性ドメインとしN-イソプロピルアクリルアミドとメタクリル酸との共重合体(モル比22:1)を温度応答性ドメインとするブロック共重合体を合成した。本ブロック共重合体を、クロロホルム-エタノール(9:1)の混合溶媒に溶解し、プラズマ放電処理した厚さ100μmのポリエステル不織布にコーティングした。

【0024】本不織布をφ25に打ち抜いて容器に入れ、5mg/mlの1-エチル-3-(ジメチルアミノ)プロピル)カルボジイミド(シグマ社製)溶液を20ml(pH5.5)シャーレに注入し、5分間室温で放置した。続いて、アビジンの10mg/ml溶液を1ml添加し、室温で1時間時々攪拌しながら放置した。さらに、グリシンを最終濃度で0.2モルとなるように添加して1時間放置した後、リン酸バッファー(PBS)でリンスした。このアビジン固定化不織布は、PBS中で4℃で保存した。

【0025】CD4⁺細胞とアビジンに特異的に吸着する物質として、ビオチン標識したCD4抗体を購入(イムノテック)し、アビジン固定化不織布にPBS中でインキュベートすることにより結合させて分離材料を得た。この分離用不織布を5枚積層してφ25mmのフィルターホルダーにセットして、人新鮮血のバフィーコー

トより採取し1%アルブミンを添加したPBSで洗浄して調整した白血球液(1×10^5 /ml)を25℃でゆっくりと10ml流すことにより分離用不織布に吸着させた。吸着した細胞の溶出は、温度を35℃に上昇させて、1%アルブミンを添加したPBSを流すことで行った。その結果、純度94%、回収率53%でCD4⁺細胞を回収することができた。

【0026】(実施例2)実施例1と同様の方法で作製したアビジン固定化不織布を、φ25mmのフィルターホルダーに5枚積層することにより分離モジュールを作製した。骨髓から得たバフィーコートより1%アルブミンを添加したPBSで洗浄して調整した白血球液(1×10^6 /ml)に、ビオチン標識したCD34抗体を添加した後、前述の分離モジュールに定量ポンプで0.5ml/minで流した。吸着した細胞の溶出は、温度を35℃に上昇させて1%アルブミンを添加したPBSを流すことで行った。その結果、純度95%、回収率48%でCD34⁺細胞を回収することができた。

【0027】

【発明の効果】本発明の分離材料や分離方法は、標的物質を選択的に吸着する物質Aを使用して標的物質を吸着し、刺激応答性高分子の高次構造変化により解離する物質Bと物質Cの結合により分離材料に保持させているため、標的物質への高い選択性が得られ、かつ標的物質の変性や機能変化が少ない状態で、外部刺激(環境変化)により簡便に脱離させて回収することが可能となる。また、従来困難であった血球系細胞や機能細胞の詳細な分離が容易にできるため、特殊な細胞を分離して、必要により増殖・機能変換させて再び生体内に戻す細胞治療や遺伝子治療に有効な分離技術等として効果を発揮することとなる。また、本分離材料や分離方法は、標的物質を各種のバイオプロダクト、生体関連物質や化学物質とすることで、バイオ産業、医薬品産業、化学工業から診断・治療などの医療分野に至るまで、広範に利用できる技術となる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

C12N 1/02

識別記号

庁内整理番号

7236-4B

F I

技術表示箇所